

VU Research Portal

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for bone tissue engineering

Knippenberg, M.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Knippenberg, M. (2007). *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for bone tissue engineering*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

ALGEMENE SAMENVATTING

Aantrekkelijke translationele doeleinden voor bot tissue engineering en regeneratieve geneeskunde zijn onder andere aandoeningen aan het skelet, zoals degeneratieve afwijkingen van de lumbale ruggewervels. Bot tissue engineering combineert cellen, biomaterialen, bij voorkeur bioabsorbeerbaar, en “biologics” (biologische stimuli om de differentiatie van stamcellen te induceren). Mesenchymale stamcellen (MSCs), die gebruikt worden voor tissue engineering, kunnen worden geïsoleerd uit beenmerg, wat slechts in gelimiteerde hoeveelheden te verkrijgen is. Vergeleken met beenmerg is vetweefsel een veel rijkere bron aan MSCs en is, bijvoorbeeld door liposuctie, gemakkelijker toegankelijk. De uit vetweefsel verkregen MSCs (AT-MSCs) kunnen differentiëren tot kraakbeen-, spier- en vetcellen. Daarnaast hebben AT-MSCs een *in vivo* botvormend vermogen, vergelijkbaar met dat van beenmerg MSCs en bijna vergelijkbaar met dat van osteoblasten. AT-MSCs zijn derhalve een veelbelovende bron van stamcellen die gebruikt kunnen worden voor bot tissue engineering, met als uiteindelijke doel het functioneel herstel van botweefsel. Een voorbeeld van een toepassing van bot tissue engineering is het aanbrengen van lumbale wervelfusies bij patiënten met verschillende degeneratieve aandoeningen aan de lumbale wervelkolom, wanneer andere niet-chirurgische behandelingen geen uitkomst bieden.

Dit proefschrift beschrijft de functionaliteit van AT-MSCs voor bot tissue engineering en stelt een nieuw concept voor van een “one-step” chirurgische methode voor lumbale wervelfusie. De volgende vragen worden aan de orde gesteld:

- Beïnvloeden de methoden ter verkrijging van vetweefsel de opbrengst en groei kenmerken, dus kwantiteit en kwaliteit van AT-MSCs?
- Reageren de AT-MSCs tijdens hun differentiatie tot botcellen op dezelfde manier als botcellen op mechanische belasting middels een pulserende vloeistofstroom?
- Hebben de prostaglandines PGE_2 , PGI_2 en PGF_2 een effect op de differentiatie van AT-MSCs?
- Beïnvloeden bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) en/of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) de modificatie van de collageenmatrix geproduceerd door AT-MSCs?

- Worden AT-MSCs geprikkeld in hun osteogene differentiatie door een korte behandeling (30 min) met het polyamine spermine?
- Worden AT-MSCs geprikkeld in hun osteogene en/of chondrogene differentiatie door een korte behandeling (15 min) met de groeifactoren BMP-2 of BMP-7?

Ter beantwoording van deze vragen werden AT-MSCs geïsoleerd uit humaan of geitenvetweefsel. De AT-MSCs werden of wel direct gebruikt na isolatie dan wel gekweekt voor 3-4 passages. Vervolgens werden de cellen aan osteogene differentiatie-inducerende stoffen blootgesteld of mechanisch belast middels een pulserende vloeistofstroom *in vitro*.

Bot tissue engineering wordt gebruikt voor lumbale wervelfusies in patiënten met verschillende degeneratieve aandoeningen van de lumbale wervelkolom. In hoofdstuk 2 doen wij een voorstel voor een alternatieve chirurgische benadering waarbij gebruik gemaakt wordt van autologe AT-MSCs in plaats van de huidige klinische praktijk voor wervelfusie. AT-MSCs worden geïsoleerd uit onderhuids vetweefsel afkomstig van de operatie plek en daarna gestimuleerd met een bio-inductieve agentia in hun osteogene differentiatie. De cellen worden op een dragermateriaal uitgezaaid dat vervolgens wordt geplaatst in een biologisch afbreekbare zogenaamde “interbody cage”, een soort kooistructuur, en tenslotte geïmplantéerd in de patiënt tijdens één enkele operatie van 2 tot 3 uur. Deze bot tissue engineering benadering voor wervelfusie heeft als uiteindelijke doel om het botweefsel tussen de wervels functioneel te herstellen.

Vetweefsel, nodig voor het isoleren van AT-MSCs kan op drie verschillende manieren worden verkregen, namelijk via reguliere resectie, tumescente liposuctie en ultrasonisch ondersteunde liposuctie. Deze verschillende isolatiemethoden beïnvloeden de kwaliteit en kwantiteit van de geïsoleerde AT-MSCs. In hoofdstuk 3 wordt beschreven dat ultrasonisch ondersteunde liposuctie zowel het aantal als de delingscapaciteit van de geïsoleerde AT-MSCs verlaagt. De andere genoemde methoden, reguliere resectie en tumescente liposuctie, verdienen daarom de voorkeur om te worden gebruikt ter verkrijging van vetweefsel om AT-MSCs te isoleren.

Om botweefsel te construeren zijn mechanogevoelige cellen nodig die botcel-specifieke functies kunnen uitoefenen, zoals de aanpassing van botmassa en structuur aan de mechanische omgeving ter voorkoming van mechanisch falen.

Osteocyten zijn de rijpe botcellen, waarvan algemeen wordt aangenomen dat ze de stroom van de extracellulaire vloeistof in het lacuno-canaliculaire systeem kunnen voelen, hetgeen resulteert in een verhoogde productie van stikstofdioxide (NO) en prostaglandines, alsmede een verhoogde genexpressie van een sleutelenzym in de synthese van prostaglandines, cyclooxygenase-2 (COX-2), door deze cellen. NO en prostaglandines zijn signaalmoleculen die betrokken zijn bij de botadaptatie. Hoofdstuk 4 laat zien dat AT-MSCs die 1,25-dihydroxyvitamine D₃-geïnduceerde osteogene differentiatie ondergaan, op een botcelachtige manier reageren op pulserende vloeistofstroom door middel van een verhoogde NO productie en opregulatie van hun COX-2 genexpressie. Dit toont aan dat AT-MSCs die osteogene differentiatie ondergaan, botcel-specifieke functies kunnen uitoefenen zoals de aanpassing van botmassa en architectuur aan de mechanische vereisten.

COX-2 is het sleutelenzym in de door mechanische belasting geïnduceerde prostaglandine productie. Prostaglandines zijn multifunctionele regulatoren in bot. Rijpe botcellen produceren prostaglandine E₂ (PGE₂), PGI₂ en PGF_{2α} in respons op een pulserende vloeistofstroom, en van PGE₂, maar niet van PGI₂ of PGF_{2α}, is aangetoond dat het botcelvoorlopercellen rekruteert vanuit de beenmergholte en dat het hun osteogene differentiatie induceert. In hoofdstuk 5 hebben wij de effecten van PGE₂, PGI₂ en PGF_{2α} op de osteogene differentiatie van AT-MSCs getest. Alleen PGF_{2α} leidde tot een verhoogde activiteit van alkalische fosfatase en α1(I)procollageen genexpressie in AT-MSCs. PGI₂ en PGF_{2α} verhoogden de genexpressie van osteopontine, terwijl PGE₂ geen effect had op zowel de activiteit van alkalische fosfatase en de genexpressie van α1(I)procollageen en osteopontine. Deze resultaten suggereren dat PGF_{2α} potenter is dan PGE₂ en PGI₂ met betrekking tot het induceren van osteogene differentiatie van AT-MSC, en dat de *in vivo* productie van PGF_{2α} door botcellen gunstig kan zijn voor het bevorderen van de osteogene differentiatie van AT-MSCs tijdens toepassingen van bot tissue engineering.

Voor bot tissue engineering hoeven osteogeen differentiërende AT-MSCs niet alleen te reageren op botspecifieke factoren, maar ze dienen ook één van de belangrijkste functies van osteoblasten te kunnen uitoefenen, namelijk de depositie van collageen extracellulaire matrix van bot. Bot extracellulaire matrix bestaat voornamelijk uit organisch type I collageen en dient als opslag van groeifactoren zoals bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) en transforming growth factor-β1 (TGF-β1). Type I collageen dient post-translationeel gemodificeerd te worden door

lysylhydroxylases en lysyloxidases voordat het kan bijdragen aan de mechanische elasticiteit van de organische extracellulaire matrix van bot. Omdat BMP-2 en TGF- β 1 de osteogene differentiatie van stamcellen kunnen induceren, wordt in hoofdstuk 6 een vergelijking gemaakt tussende effecten van BMP-2 en TGF- β 1 op de genexpressie van α 2(I)procollageen, PLOD1, 2 en 3, welke coderen voor lysylhydroxylase 1, 2 en 3, en van lysyloxidase. Het effect van BMP-2 en TGF- β 1 verschilde wat betreft hun expressie van deze genen in AT-MSCs. Al met al lijken AT-MSCs in staat te zijn type I collageen op de juiste manier te modificeren om een functionele organische bot extracellulaire matrix te vormen voor bot tissue engineering, afhankelijk van de gebruikte groeifactor.

Na de validatie van de biologische functionaliteit van AT-MSCs voor de regeneratie van bot, vraagt het concept van de "one-step" chirurgische methode (hoofdstuk 2) de inductie van osteogene differentiatie van AT-MSCs in een kort tijdsbestek. Hoofdstuk 7 beschrijft het gebruik van het polyamine spermine om de verlangde initiële osteogene triggering van AT-MSCs binnen 30 min te bewerkstelligen. Polyamines, organische kationen die betrokken zijn bij de celdeling en -differentiatie, zijn ook van belang gebleken bij de botgroei en ontwikkeling. We hebben aangetoond dat een 30 min durende behandeling met spermine de osteogene differentiatie van AT-MSCs onmiddellijk na hun isolatie induceert. Incubatie van AT-MSCs met spermine voor slechts 30 min zou kunnen passen in het tijdsbested van de "one-step" methode en zou kunnen leiden tot een verbeterde wervelfusie.

BMP-2 is van cruciaal belang voor de osteogene differentiatie, terwijl BMP-7 een sterk anabolisch effect heeft op de ontwikkeling van jong en volwassen kraakbeen. Hoofdstuk 8 vergelijkt de effecten van een 15 min durende behandeling met lage concentraties (10 ng/ml) BMP-2 of BMP-7 op de osteogenese en chondrogenese van AT-MSCs onmiddellijk na isolatie. BMP-2 induceerde de differentiatie van AT-MSCs langs de osteogene lijn, terwijl BMP-7 een meer chondrogeen fenotype stimuleerde. De botgroeifactor BMP-2 induceerde osteogene differentiatie van AT-MSC, die zich in de stromale vasculaire fractie van het vetweefsel bevinden, en die daarom gebruikt zouden kunnen worden om AT-MSCs osteoogeen te prikkelen tijdens de voorgestelde "one-step" procedure voor wervelfusie (hoofdstuk 2).

Tot slot bediscussiëren we in hoofdstuk 9 de toepasbaarheid van AT-MSCs in bot tissue engineering, zoals bij wervelfusie, alsmede het concept van de "one-step" chirurgische methode. De voor bot tissue engineering gebruikte AT-MSCs

pruduceren hoogstwaarschijnlijk hun eigen extracellulaire matrix, en na transplantatie in de patiënt worden AT-MSCs waarschijnlijk gestimuleerd om extracellulaire matrix te produceren door prostaglandines, zoals $\text{PGF}_{2\alpha}$, dat lokaal door osteocyten in het omringende verkalkte bot geproduceerd wordt. Na de differentiatie tot rijpe botcellen *in vivo*, kunnen AT-MSCs waarschijnlijk vloeistof schuifkrachten waarnemen en botremodelering aansturen. Hoofdstuk 9 stelt ook voor dat BMP-2 te prefereren is boven BMP-7 en spermine als trigger voor osteogene differentiatie van AT-MSCs tijdens de “one-step” chirurgische methode voor wervelfusie, vanwege zijn osteogene vermogen en de commerciële beschikbaarheid als FDA-goedgekeurd humaan-recombinant eiwit. Spermine kan echter als alternatief voor BMP-2 dienen als osteogene trigger in toekomstige klinische toepassingen van de “one-step” methode, vanwege zijn kosteneffectiviteit. Om de toepasbaarheid van deze “one-step” methode voor wervelfusie te bestuderen, beschrijven wij in hoofdstuk 9 de studie die werd uitgevoerd in de Nederlandse melkgeit. We hebben “interbody cages” gebruikt, gemaakt van 70/30 poly(L-lactide-co-D,L-lactide) en gevuld met bifasisch calcium-fosfaat al dan niet bezaaid met AT-MSCs, die met of zonder BMP-2 gedurende 15 min behandeld waren om de osteogene differentiatie van AT-MSCs te induceren. De uiteindelijke resultaten zullen na de voltooiing van dit proefschrift worden verkregen. Deze studie bewijst echter dat de “one-step” chirurgische methode voor wervelfusie met behulp van tissue engineering principes haalbaar is, en niet meer tijd kost dan de huidige standaard chirurgische procedure.

AT-MSCs kunnen waarschijnlijk in het botweefsel *in vivo* reïntegreren, om extracellulaire bot matrix te vormen, en om als rijpe botcellen te functioneren na volledige differentiatie. De AT-MSCs kunnen worden geïsoleerd uit vetweefsel dat is verkregen door resectie of tumescente liposuctie, en kunnen vervolgens worden getriggerd door een 15 min durende BMP-2 behandeling of door een 30 min durende spermine stimulatie. Deze combinatie van isolatie en triggering kunnen perfect worden uitgevoerd binnen het tijdsbestek van de “one-step” chirurgische methode. In conclusie, AT-MSCs vormen een innovatieve cellulaire basis voor bot tissue engineering, alsmede voor de voorgestelde klinische “one-step” operatie methode voor wervelfusie.